

Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose

Cleverson Diniz Teixeira de Freitas^{1*}, Marcio Viana Ramos², Diego Pereira Souza²,
Jose Delano Barreto Marinho-Filho², Fabiano Moura Teixeira², Jefferson Soares de Oliveira³

¹Campus Amílcar Ferreira Sobral, Universidade Federal do Piauí, Floriano, PI, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: cleversondiniz@hotmail.com

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Campus Ministro Reis Veloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil

Resumo

Lectinas purificadas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Cratylia floribunda* (CFL) foram testadas quanto a atividade inseticida sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). ConBr e CFL causaram efeitos deletérios sobre o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* nas concentrações de 1% e 2% (p/p). O tempo de desenvolvimento dos insetos alimentados com as sementes artificiais contendo ConBr ou CFL não foi significativamente alterado, entretanto a porcentagem de emergência diminuiu. Ambas lectinas foram resistentes a ação hidrolítica de proteases intestinais de larvas de *C. maculatus*. Dietas artificiais contendo as lectinas não causaram efeitos deletérios sobre a massa corporal e a sobrevivência de ninfas de *D. peruvianus*. Proteases intestinais extraídas de *D. peruvianus* foram capazes de hidrolisar ConBr e CFL após 2 horas de incubação. A habilidade dos insetos para digerir as lectinas parece estar diretamente relacionada ao efeito inseticida observado.

Palavras-Chaves: Proteínas ligantes a carboidratos, *Callosobruchus maculatus*, *Dysdercus peruvianus*, lectinas.

Relationship of Insecticidal Activity and Resistance to Proteolysis of Two Glucose/Mannose Plant Lectins

Abstract

Purified seed lectins from the legumes *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Cratylia floribunda* (CFL) were tested for insecticidal activity against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). ConBr and CFL caused negative effects on larvae of *C. maculatus* at levels of 1% and 2% (w/w). Time of development of *C. maculatus* insects, grown in artificial seeds containing both lectins, was not significantly altered, but the emergence was slightly diminished. Both lectins were resisted to proteolysis by gut proteases of *C. maculatus* larvae. Artificial diets containing 1% and 2% of ConBr or CFL caused no effect on weight and survival of *D. peruvianus* nymphs. Gut proteases of *D. peruvianus* were able to breakdown ConBr and CFL after 2 hours of incubation. The ability of insects to digest the proteins was correlated directly with the deleterious effect observed.

Key words: Carbohydrate-binding proteins, *Callosobruchus maculatus*, *Dysdercus peruvianus*, lectins.

Introdução

O uso de sementes como fonte de alimento pelo homem foi, certamente, um dos grandes estímulos para o início da atividade agrícola. Apesar da existência de milhares de espécies vegetais produtoras de sementes, apenas algumas são utilizadas na dieta animal e humana. Isso se deve ao fato que muitas destas sementes não possuem componentes adequados à dieta ou possuem toxicidade intrínseca (Lajolo & Genovese, 2002). Além do baixo número de sementes disponíveis para a alimentação, estas ainda têm sua produtividade bastante diminuída pelo ataque de várias pragas e patógenos (Carlini & Grossi-de-Sa, 2002).

Atualmente, a principal forma de controlar estes agressores é através do uso de produtos químicos, aos quais estão associados a uma série de desvantagens, tais como a falta de especificidade, incidência de resistência sobre aplicações prolongadas e os riscos ambientais e alimentares inerentes à toxicidade residual. Devido a essas limitações, a busca por controles alternativos é de extrema relevância, destacando-se a descoberta de novos agentes seguros, biodegradáveis, naturais e de fácil obtenção. Nesse sentido, significativos esforços têm sido direcionados para a identificação de novas proteínas de origem vegetal, visando a produção de sementes resistentes a insetos (Ramos et al., 2010).

Lectinas são proteínas estruturalmente heterogêneas que compartilham propriedades comuns de ligar-se especificamente a monossacarídeos e alguns de seus derivados correspondentes (Rudiger & Gabiius, 2001). Geralmente, as lectinas são constituídas de protômeros com características estruturais que têm sido útil para agrupá-las em famílias (Van Damme et al., 1998). O arranjo tridimensional diferencial dos protômeros das lectinas é responsável pela grande diversidade de estruturas quaternárias conhecidas. Independente da diversidade estrutural, as lectinas mantêm como propriedade comum a capacidade de ligar-se a carboidratos e discriminar glicoconjugados complexos de acordo com suas estruturas lineares, ou seja, composição dos monossacarídeos e a natureza do padrão de ligações glicosídicas (Ramos et al., 2002; Wu et al., 2003; Debray et al., 2009).

Independente das propriedades estruturais e de ligação, as lectinas são amplamente distribuídas em plantas e são particularmente abundantes em sementes (Coelho et al., 2009). As lectinas têm sido investigadas em relação ao seu possível papel na defesa de plantas contra mamíferos, insetos e fitopatógenos (Vasconcelos & Oliveira, 2004; Macedo et al., 2007; Chen et al., 2009).

No entanto, a tentativa de atribuir um papel de defesa para lectinas de plantas ainda é limitada, já que algumas lectinas investigadas

mostraram toxicidade contra alguns organismos agressores e para outros não (Murdock et al., 1990; Sadeghi et al., 2006). A discussão em torno das propriedades de ligação a carboidratos das lectinas e sua atividade defensiva tem sido questionada, porque estudos anteriores mostraram o efeito deletério de lectinas com afinidade para N-acetilgalactosamina/galactose sobre o *Callosobruchus maculatus*. Contudo, nesse mesmo trabalho os autores não discutiram a ausência ou a pequena ação inseticida de algumas lectinas com afinidade a glicose/manose, incluindo a lectina de semente de *Canavalia ensiformis* (ConA) (Murdock et al., 1990). A lectina ConA mostrou baixa ação inseticida contra *C. maculatus*, mas exibiu ação inseticida contra o afídeo da ervilha *Acyrtosiphon pisum* (Savvion et al., 2004).

No presente estudo foram purificadas duas lectinas cujas propriedades estruturais e de ligação a carboidratos são bem documentadas (Calvete et al., 1999; Ramos et al., 2002), com o objetivo de avaliar seus efeitos tóxicos sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruceidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), insetos pragas que causam danos relevantes a sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) e de algodão (*Gossypium hirsutum*), respectivamente. O trabalho também avaliou a correlação entre a atividade tóxica e a suscetibilidade das lectinas frente às proteases intestinais de ambos os insetos.

Material e Métodos

Sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* foram coletadas ao longo da costa do Estado do Ceará, Brasil. O material botânico foi identificado por um taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde existem exsiccatas das duas espécies. Sementes de *Vigna unguiculata* usadas para manutenção da colônia de insetos e nos bioensaios foram obtidas comercialmente. As sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) foram oriundas de plantações livres de agrotóxico, obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Algodão (IAC-Instituto Agrônomo de Campinas).

As lectinas foram purificadas a partir da extração de 40 g de farinha das sementes em 400 mL de NaCl 150 mM, por 2 horas a 25°C, seguida de centrifugação (10.000g, 30 minutos, 4°C). Os sobrenadantes foram filtrados em papéis de filtro e os precipitados descartados. Os sobrenadantes límpidos, denominados, extratos brutos, foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, previamente equilibrada com NaCl 150 mM. Após a eluição das proteínas não retidas na coluna, com a solução de equilíbrio, as lectinas de *C. brasiliensis* (ConBr) e *C. floribunda* (CFL) foram recuperadas da coluna pela adição de glicose 100 mM na

solução de equilíbrio. A eluição dos picos foi monitorada por espectrofotômetro a 280 nm. Cada lectina recuperada da coluna foi dializada contra ácido acético 100 mM por 1 hora, seguida de uma nova diálise contra água destilada por 48 horas a 8°C. As amostras foram posteriormente liofilizadas e armazenadas até uso.

Para checar a pureza das lectinas obtidas após as cromatografias de afinidade, eletroforeses em géis de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS e agente redutor (2-mercaptoetanol) foram realizadas como descrito anteriormente (Laemmli, 1970). As corridas foram conduzidas a 25 mA, por 2 horas a 25°C. As bandas protéicas foram visualizadas após serem coradas com Coomassie Brilliant Blue (R-350) 0,1% em água: ácido acético: metanol (6:1:3 v:v:v) ou reveladas com prata.

A atividade das lectinas foi verificada pela capacidade destas em aglutinar eritrócitos de coelho. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços usando uma suspensão de eritrócitos a 2% e as lectinas (1 mg mL⁻¹) em solução salina 150 mM, segundo procedimento experimental previamente descrito (Oliveira et al., 2002). Os resultados foram expressos como os inversos das maiores diluições capazes de provocar a aglutinação completa dos eritrócitos.

Para estimar o efeito tóxico de ambas as lectinas (ConBr e CFL) no desenvolvimento de *C. maculatus*, foram realizados bioensaios utilizando sementes artificiais contendo quantidades crescentes de cada lectina (Macedo et al., 2002). Cada lectina foi misturada à farinha de feijão para a obtenção das seguintes concentrações: 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0% (p/p). Essas concentrações foram escolhidas porque a ocorrência de lectinas em sementes é estimada em 0,5-2,0% (Macedo et al., 2002). As misturas obtidas foram adicionadas e prensadas em cápsulas de gelatina obtidas comercialmente. Os ensaios foram realizados em câmara de crescimento a 27±2°C, umidade relativa de 65% e fotoperíodo de 12 horas.

Cada grupo experimental foi composto de 4 repetições com 10 sementes artificiais. Fêmeas (n=10) fertilizadas de 2-3 dias de idade foram colocadas para ovopositar sobre as sementes artificiais durante 48 horas. O número de ovos foi contado e ajustado para 5 ovos por semente (n=200). As sementes foram colocadas dentro de frascos transparentes com tampas perfuradas, para permitir a troca de gases, e mantidas em câmara de crescimento a 27±2°C e umidade de 65%. Dois ensaios independentes foram conduzidos, um para avaliar o desenvolvimento e a sobrevivência larval e outro para avaliar o tempo de desenvolvimento e o percentual de emergência dos insetos adultos. Após 17 dias, as sementes designadas para a análise de desenvolvimento larval foram abertas, o número e o peso das larvas foram determinados. No segundo ensaio, as sementes não foram abertas, permitindo desta forma que

as larvas se desenvolvessem em insetos adultos e emergissem das sementes artificiais. Foram avaliados o percentual de insetos emergidos e o tempo de emergência, expresso como número de dias depois da eclosão dos ovos.

Para determinar o efeito de ConBr e CFL no desenvolvimento de *D. peruvianus*, foram realizados bioensaios utilizando dietas artificiais contendo concentrações crescentes das lectinas purificadas como descrito por Stanisçuaski et al. (2005). Ninfas de *D. peruvianus* foram alimentadas com sementes de algodão e mantidas a 23±2°C, umidade 60-70%, com ciclo de 16 horas de luz e 8 de escuro. Sementes de algodão foram cortadas para permitir a retirada dos cotilédones e uma fina farinha foi preparada em moinho elétrico. Ambas as lectinas foram dissolvidas em 400 µL de água destilada e rapidamente misturadas com 300 mg de farinha de cotilédones de algodão. Sementes artificiais foram preparadas usando cápsulas de gelatina preenchidas com as misturas após liofilização (Stanisçuaski et al. 2005). Cada grupo experimental foi conduzido em triplicata e contendo 15 ninfas do 3º estágio (n=45).. As lectinas (ConBr e CFL) foram adicionadas às dietas nas concentrações 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0%. Sementes artificiais, controles, foram preparadas da mesma maneira, com volumes equivalentes de água destilada. A massa corporal e a taxa de sobrevivência dos insetos foram avaliados durante 14 dias.

A capacidade de proteases intestinais dos insetos *C. maculatus* e *D. peruvianus* em digerir as lectinas ConBr e CFL foi avaliada, para correlacionar a toxicidade das lectinas com sua capacidade em resistir a digestão por proteases dos insetos.

Homogenatos dos tratos intestinais de larvas de *C. maculatus* foram preparados como descrito por Macedo et al. (2000). Os tratos intestinais de 50 larvas de 17 dias, alimentadas com sementes de *V. unguiculata*, foram dissecados e as proteases foram extraídas com 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,6).

Homogenatos dos tratos intestinais de ninfas de *D. peruvianus* foram obtidos como descrito por Stanisçuaski et al. (2005). Vinte e cinco ninfas do quarto estágio, alimentadas com sementes de *G. hirsutum*, foram dissecadas e os intestinos homogeneizados em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,6). Ninfas do 4º estágio foram escolhidas porque elas representam o estágio observado próximo do 7º dia do experimento.

A atividade proteolítica dos extratos intestinais obtidos foi determinada utilizando azocaseína com substrato (Xavier-Filho et al., 1989). Uma mili-unidade (mUA) de atividade azocaseinolítica foi definida com a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,001 a pH 5,6 e 37°C por 1 hora.

As lectinas ConBr e CFL foram incubadas

com os homogenatos para obter uma razão de atividade enzimática/lectina de 0,5 mUA mg⁻¹. A digestão das lectinas foi desenvolvida em diferentes intervalos de tempo (0,5, 2, 4 e 8 horas) e os produtos das digestões foram avaliados em eletroforese em gel de poliácridamida (12,5%) na presença de SDS e ausência de agente redutor.

Os dados correspondentes ao tempo de desenvolvimento foram analisados pelo método de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores com p>0,05 não foram considerados significativamente diferentes.

Resultados e Discussão

A pureza das lectinas ConBr e CFL usadas nos bioensaios pode ser analisada na Figura 1. As lectinas aparecem como uma combinação de quatro bandas protéicas principais, correspondendo a sua cadeia polipeptídica inteira (cadeia α, MM = 25.397 Da) e fragmentos de ocorrência natural (β, MM = 12.847 e γ, MM = 12.568 Da) derivados de eventos pós-transcricionais da cadeia α (Grangeiro et al., 1997; Calvete et al., 1999). Todos esses fragmentos gerados são visualizados apenas quando as lectinas são tratadas com um agente redutor. As lectinas purificadas mostraram-se ativas e após tratamento térmico elas perderam a capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho (Tabela 1).

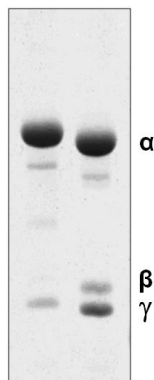


Figura 1. Eletroforese em gel de poliácridamida (12,5%) na presença de SDS e 2-mercaptoetanol das lectinas: ConBr (esquerda) e CFL (direita). Foram aplicados 8 µg de cada lectina. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-350.

Tabela 1. Atividade hemaglutinante das lectinas ConBr e CFL utilizando uma suspensão de eritrócitos de coelho à 2%.

Lectinas	UH mL ⁻¹		µg mL ⁻¹	Especificidade
	Nativa	Aquecida*		
ConBr	2048	ND**	0,244	Glicose/Manose
CFL	2048	ND**	0,244	Glicose/Manose

*Aquecida a 98°C por 30 minutos. **ND Não Detectado.

O primeiro bioensaio foi realizado para avaliar os possíveis efeitos deletérios de cada lectina sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus*. As lectinas foram usadas nas concentrações correspondentes de 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0% (p/p). Os parâmetros massa larval e número de larvas em relação ao número de ovos eclodidos

foram determinados. Nas concentrações de 0,2 e 0,5%, as lectinas não causaram nenhum efeito adverso nos parâmetros avaliados (Figura 2). Resultados anteriores sugerem que lectinas com afinidade a glicose/manose não são deletérias para o *C. maculatus* ou apresentam baixa toxicidade, se comparada à atividade inseticida de outras lectinas com afinidade a galactose ou N-acetilglicosamina (Gatehouse et al., 1995).

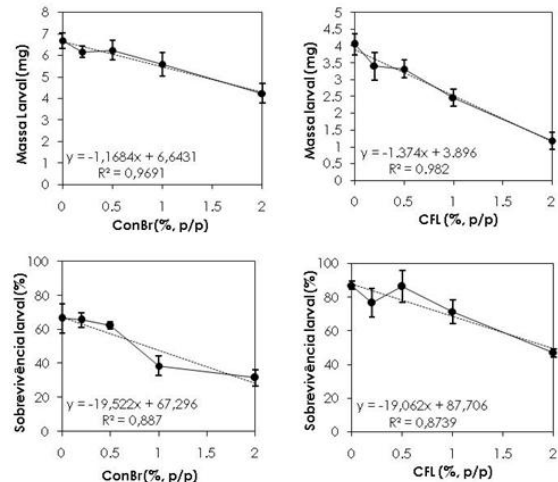


Figura 2. Efeito das lectinas ConBr e CFL sobre a massa e a sobrevivência larval de *Callosobruchus maculatus*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. As barras de erros indicam os desvios padrões.

Nas concentrações de 1% e 2%, as lectinas ConBr e CFL causaram efeitos deletérios sobre a massa e a sobrevivência larval de *C. maculatus* (Figura 2). Na concentração de 2%, a lectina CFL foi mais tóxica que a ConBr, reduzindo a massa das larvas em 74%, enquanto a ConBr causou um decréscimo de 36%. O percentual de sobrevivência larval também foi reduzido em sementes artificiais contendo ConBr e CFL na concentração de 2%. As concentrações de 1,7% e 2,3% foram estimadas como aquelas capazes de reduzir em 50% a sobrevivência larval (LD50) para ConBr e CFL, respectivamente. Ambas as lectinas foram deletérias para larvas quando testadas na concentração de 2%. Contudo, há relatos de lectinas que foram mais tóxicas, como é o caso da lectina específica para glicose/manose de sementes de *Talisia esculenta* (Macedo et al., 2002).

A avaliação do percentual de emergência dos insetos adultos de *C. maculatus* desenvolvidos em sementes artificiais contendo ConBr e CFL está apresentada na Figura 3. Nas menores concentrações (0,2% e 0,5%), as lectinas ConBr e CFL não causaram decréscimo na sobrevivência dos insetos. Contudo, ConBr reduziu a emergência em 33,0%, e CFL em 35,6%, quando testadas a 2%. Ambas as lectinas não causaram efeito deletério significativo sobre o tempo de desenvolvimento dos insetos, mesmo na concentração de 2% (Tabela 2). Resultados similares foram encontrados para a lectina ConA, que mostrou efeito deletério somente

em concentrações superiores a 2% (Oliveira et al., 1999). Por outro lado, Machuka et al. (2000) mostraram que uma lectina com afinidade a galactose de sementes de *Sphenostylis stenocarpa* foi deletéria para *C. maculatus* quando utilizada em sementes artificiais na concentração de 0,2%.

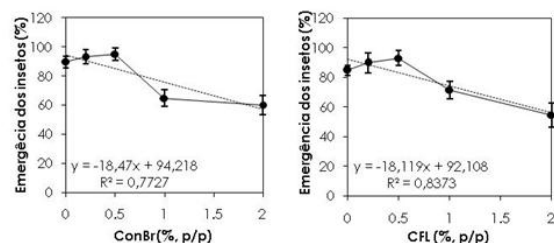


Figura 3. Efeito das lectinas ConBr e CFL sobre o percentual de emergência de *Callosobruchus maculatus*. Cada ponto representa a média de quatro repetições. As barras de erros indicam os desvios padrões.

Tabela 2. Tempo médio de desenvolvimento em dias de insetos *Callosobruchus maculatus* alimentados com sementes artificiais contendo diferentes concentrações das lectinas ConBr e CFL.

Lectinas	Concentração (% p/p)				
	0	0,2	0,5	1	2
ConBr	28,0 ± 3,1 ^a	29,0 ± 2,3 ^a	27,0 ± 1,3 ^a	31,0 ± 1,9 ^a	32,0 ± 2,9 ^a
CFL	30,0 ± 2,0 ^a	32,8 ± 3,0 ^a	32,7 ± 1,0 ^a	33,6 ± 3,0 ^a	33,6 ± 4,0 ^a

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo método de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Outra estratégia utilizada para avaliar a ação das lectinas ConBr e CFL sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* envolveu a análise da susceptibilidade das lectinas à digestão por proteases intestinais do inseto. Ambas lectinas resistiram parcialmente à proteólise, mesmo após 8 horas (Figura 4) e 24 horas de incubação (dados não mostrados). A resistência à proteólise foi verificada para outras lectinas inseticidas (Macedo et al., 2002). A capacidade em resistir à proteólise intestinal é uma das características principais de proteínas inseticidas, desde que elas podem permanecer por mais tempo ativas e exercerem sua ação tóxica no trato digestório dos insetos (Carlini & Grossi-de-Sa, 2002).

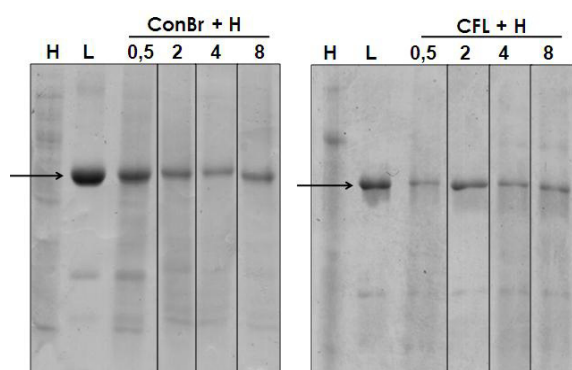


Figura 4. Eletroforeses em géis de poliacrilamida (12,5%) das lectinas ConBr (esquerda) e CFL (direita), na presença de SDS e ausência de 2-mercaptoetanol, e incubadas a 37°C por 0,5, 2, 4 e 8 horas com proteases intestinais de larvas de *Callosobruchus maculatus*. H: Homogenato; L: Lectina. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-350. Setas indicam as bandas referentes às lectinas.

Callosobruchus maculatus causa perdas severas em sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*). O seu ataque pode inicia-se no campo, mas ocorre de forma mais intensa em grãos armazenados. Ele afeta não somente a redução do peso dos grãos, mas também o valor nutritivo e o poder germinativo (Azevedo et al., 2007). Em vista disso, diversos métodos são estudados para controlar o crescimento deste inseto. Um deles é o estudo de proteínas vegetais com propriedades inseticidas, como é o caso das lectinas.

É notável que o gorgulho apresente especificidade considerável para atacar sementes de *V. unguiculata*, mesmo com a presença de diferentes proteínas anti-metabólicas (Xavier Filho et al., 1989). Essa resistência deve-se ao fato que esse inseto é capaz de aumentar a expressão de proteases intestinais responsáveis por degradar e inativar essas proteínas deletérias (Zhu-Salzman et al., 2003). Outro fato interessante é que *C. maculatus* não é capaz de atacar sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). A resistência destas sementes deve-se, parcialmente, à presença de uma lectina com especificidade para N-acetil-galactosamina/galactose denominada de PHA (Gatehouse et al., 1984).

A partir do momento em que é purificada e caracterizada uma proteína inseticida, o próximo passo é tentar produzi-la em sistemas heterólogos, como bactérias e leveduras, para a sua obtenção em grandes quantidades. Além disso, essas proteínas heterólogas podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas suscetíveis a insetos (Sudhakar et al., 1998; Dutta et al., 2005).

O efeito inseticida de lectinas pode ser primariamente determinado pela ligação a estruturas glicosiladas no intestino dos insetos, causando inibição da absorção de nutrientes e/ou destruição das células intestinais (Fitches et al., 2001; Vasconcelos & Oliveira, 2004). Outra possibilidade para o mecanismo de ação inseticida das lectinas vegetais é sua interação com a membrana peritrófica. Esta membrana facilita o processo digestivo do intestino e o protege contra microorganismos, parasitas e também das partículas abrasivas do alimento. A membrana peritrófica é constituída de proteínas, glicoproteínas e quitina (um polímero de resíduos de N-acetilglicosamina) (Tellam et al., 1999).

Após aquecimento a 98°C por 30 minutos, as lectinas (ConBr e CFL) perderam a atividade inseticida, sugerindo que a estrutura tridimensional das mesmas é essencial para as atividades biológicas. O desenvolvimento de *C. maculatus* não foi afetado quando alimentados com sementes artificiais contendo 2% de Albumina Sérica Bovina (dados não mostrados), demonstrando que o simples fato de se adicionar uma proteína exógena na dieta não causa nenhum efeito adverso sobre o desenvolvimento do inseto.

O segundo modelo utilizado para avaliar o possível efeito inseticida das lectinas (ConBr e CFL) foi realizado com *D. peruvianus*. As lectinas não exerceram nenhum efeito deletério significativo sobre a massa e sobrevivência das ninfas, mesmo após 14 dias de ensaio e quando testadas na concentração de 2% (Figura 5).

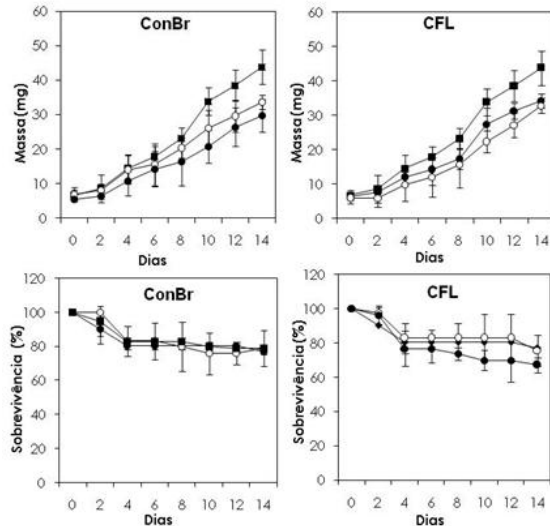


Figura 5. Efeito das lectinas ConBr e CFL na massa e sobrevivência de ninfas de *Dysdercus peruvianus*. As barras de erros indicam os desvios padrões. Controle 0% (■), ConBr ou CFL 1% (○) e 2% (●).

As proteases intestinais de ninfas do 4º estágio de *D. peruvianus* foram capazes de hidrolisar ambas lectinas. De acordo com a figura 6, a lectina ConBr foi totalmente digerida após 2 horas de incubação, enquanto a lectina CFL foi digerida mais rapidamente, após 30 minutos. Quanto mais rápida for a ação destrutiva das proteases intestinais de insetos frente a diferentes proteínas tóxicas encontradas em suas dietas, menos tempo estas estarão livres para exercerem sua atividade inseticida (Vasconcelos & Oliveira, 2004). Esses resultados corroboram com o fato das lectinas ConBr e CFL não terem promovido nenhum efeito tóxico para *D. peruvianus*. Caso contrário foi observado para os insetos *C. maculatus*, como discutido anteriormente.

O inseto *D. peruvianus*, pertencente à ordem Hemiptera e à família Pyrrhocoridae, ataca tanto as sementes como as fibras do algodão. Além disso, ele é um vetor para fungos e bactérias fitopatogênicas, podendo causar grandes perdas às plantações de algodão (Stanisçuaski et al., 2005). Ação inseticida de lectinas sobre o *D. peruvianus* ainda não é relatada na literatura. Contudo, uma toxina de *Canavalia ensiformis*, denominada de Canatoxina (CNTX), foi tóxica para o inseto em concentrações tão baixas quanto 0,01% (p/p). Recentemente, Barros et al. (2009) mostraram que um peptídeo de *C. ensiformis*, denominado de Jaburetoxina, foi tóxico para *D. peruvianus* e seu mecanismo de ação, seria a destruição da membrana peritrófica do inseto.

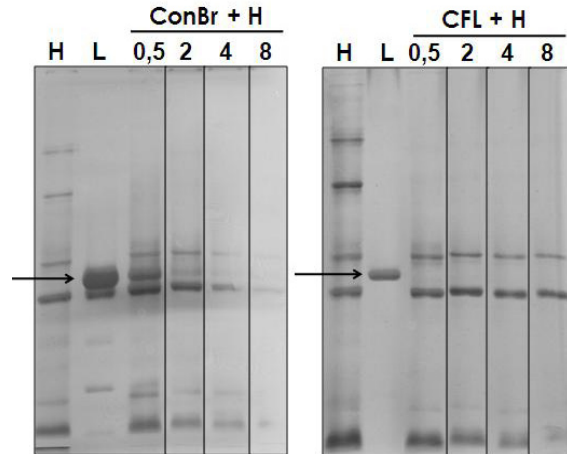


Figura 6. Eletroforeses em géis de poli-acrilamida (12,5%) das lectinas ConBr (esquerda) e CFL (direita), na presença de SDS e ausência de 2-mercaptoetanol, e incubadas a 37°C por 0,5, 2, 4 e 8 horas com homogenato intestinal de ninfas de *Dysdercus peruvianus*. H: Homogenato; L: Lectina. Os géis foram revelados com prata. Setas indicam as bandas referentes às lectinas.

Conclusões

As lectinas ConBr e CFL possuem efeito deletério, quando incorporadas em concentrações a partir de 1% em dietas artificiais e são resistentes a proteases intestinais de larvas de *C. maculatus*.

A ausência de toxicidade das lectinas para *D. peruvianus* pode ser devido à rápida digestão destas proteínas por proteases intestinais do inseto.

De acordo com os resultados, ConBr e CFL são proteínas interessantes para proteger sementes de feijão de corda contra o *C. maculatus*, mas não sementes de algodão contra *D. peruvianus*.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq, FUNCAP e IFS (International Foundation for Science) pelos recursos concedidos. À professora Célia R. Carlini e à Fernanda Stanisçuaski, do departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela orientação nos experimentos com o inseto *Dysdercus peruvianus*.

Referências

- Azevedo, F.R., Leitão, A.C.L., Lima, M.A.A., Guimarães, J.A. 2007. Eficiência de produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) armazenado. *Revista Ciência Agronômica* 38(2): 182-187.
- Barros, P.R., Stassen, H., Freitas, M.S., Carlini, C.R., Nascimento, M.A.C., Follmer, C. 2009. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of

- the action of insecticidal peptides derived from ureases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794: 1848-1854.
- Calvete, J.J., Thole, H.H., Raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Rocha, I.M.A., Guimarães, F.N., Cavada, B.S. 1999. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1430: 367-375.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sa, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.
- Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian, H., Li, C., Chen, F., Bao, J. 2009. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine* 16: 352-360.
- Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77: 934-938.
- Debray, H., Coddeville, B., Bomfim, L.R., Ramos, M.V. 2009. A simple micro-method for determining precise oligosaccharidic specificity of mannose-binding lectins. *Glycobiology* 19: 1417-1426.
- Dutta, I., Saha, P., Majumder, P., Sarkar, A., Chakraborti, D., Banerjeet, S., Das, S. 2005. The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Journal* 3: 601-611.
- Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. 2001. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin: GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*: Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae: mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology* 47: 777-787.
- Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Gatehouse, J.A. 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: Pusztai, A.J.; Bardocz, S. *Lectins biomedical perspectives*. Taylor & Francis Hants, London, U.K. p. 35-57.
- Gatehouse, A.M.R., Dewey, F.M., Dove, J., Fenton, K.A., Pusztai, A. 1984. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*-mechanism of toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 373-380.
- Grangeiro, T.B., Gatehouse, J.A., Pereira, M.N., Cavada, B.S. 1997. Investigation on the origin of the naturally occurring fragments of *Cratylia floribunda* lectin. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9: 9-13.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lajolo, F.M., Genovese, M.I. 2002. Nutritional Significance of Lectins and Enzyme Inhibitors from Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6592-6598.
- Macedo, M.L.R., Coelho, M.B., Freire, M.G.M., Machado, O.L.T., Marangoni, S., Novello, J.C. 2000. Effect of a toxic protein isolated from Zeamays seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Protein and Peptide Letters* 17: 25-31.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S. 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1571: 83-88.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B. 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 486-498.
- Machuka, J.S., Okeola, O.G., Chrispeels, M.J., Jackai, L.E.N. 2000. African yam bean seed lectins affect the development of the cowpea weevil but do not affect the development of larvae of legume pod borer. *Phytochemistry* 53: 667-674.
- Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Prat, R.C., Shade, R.E. 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29: 85-89.
- Oliveira, A.E.A., Sales, M.P., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. 1999. The toxicity of jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92: 249-255.
- Oliveira, J.T., Melo, V.M., Camara, M.F., Vasconcelos, I.M., Beltramini, L.M., Machado, O.L., Gomes, V.M., Pereira, S.P., Fernandes, C.F., Nunes, E.P., Capistrano, G.G., Monteiro-Moreira, A.C. 2002. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry* 61: 301-310.
- Ramos, M.V., Grangeiro, T.B., Freire, E.A., Sales, M.P., Souza, D.P., Araújo, E.S., Freitas, C.D.T. 2010. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. *Arthropod-Plant Interactions* 4: 57-67.
- Ramos, M.V., Cavada, B.S., Mazard, B.S., Rougé, P. 2002. Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 275-279.

Rudiger, H., Gabius, H.J. 2001. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal* 18: 589-613.

Sadeghi, A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Smagghe, S. 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry* 67: 2078-2084.

Sauvion, N., Nardon, C., Febvay, G., Gethouse, A.M.R., Rahbe, Y. 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *Journal of Insect Physiology* 50: 1137-1150.

Stanişçuaski, F., Ferreira-Dasilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C.R. 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760.

Sudhakar, D., Fu, X., Stoger, E., Williams, S., Spence, J., Brown D.P., Bharathi, M., Gatehouse, J.A., Christou, P. 1998. Expression and immunolocalisation of the snowdrop lectin, GNA in transgenic rice plants. *Transgenic Research* 7: 371-378.

Tellam, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P. 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 87-101.

Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Review in Plant Sciences* 17: 575-692.

Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44: 385-403.

Wu, A.M., Wu, J.H., Lin, L.H., Lin, S.H., Liu, J.H. 2003. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (jacalin). *Life Sciences* 72: 2285-2302.

Xavier Filho, J., Campos, F.A.P., Ary, M.B., Silva, C.P., Carvalho, M.M.M., Macedo, M.L.R., Lemos, F.J.A., Grant, G. 1989. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1139-1143.

Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman R.A., Shade R.E., Ahn, J.E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12 (2): 135-145..